

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20158

研究課題名(和文)腎癌肺転移成立におけるエピゲノムを介した細胞集団運動制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of epigenome-mediated cell population movement control mechanism in kidney cancer lung metastasis

研究代表者

藤岡 正喜(FUJIOKA, Masaki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：10648463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：転移性腎癌の完治を目指した治療戦略の確立及び転移機構の解明は、国内外の泌尿器科が抱える共通のホットトピックの一つである。現在の転移機構の概念として、細胞集団運動およびprotrusion形成を介した転移が知られている。これまでに申請者が樹立した腎癌肺高転移細胞株において細胞集団運動およびprotrusion形成の亢進が見出されている。先行研究にて高転移株特異的miRNAをノックアウトした結果、高転移株でprotrusion形成の抑制がみられた。しかし、低転移性の親株に同じmiRNAを強制発現させた際にはprotrusion形成はみられないものの細胞集団形成能が増大した。

研究成果の概要(英文)：Establishment of therapeutic strategies aimed at cure of metastatic renal cancer and elucidation of the metastatic mechanism are one of the common hot topics held by domestic and overseas urology departments. As a concept of the current metastatic mechanism, metastasis via cell mass movement and protrusion formation is known. Enhancement of cell mass movement and protrusion formation has been found in renal carcinoma high metastatic cell lines established by applicants so far. As a result of knockout of high metastatic strain specific miRNA in the previous study, suppression of protrusion formation was observed in the high metastatic strain. However, when the same miRNA was forcibly expressed in the low metastatic parent strain, the formation of protoplasts was not observed, but the cell group formation ability increased.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：転移性腎癌 肺転移 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

これまでに申請者は腎臓がん物質 EHEN 処理により誘発したラット腎細胞癌より腎癌細胞株 rRCCd5P を樹立してきた。さらに免疫状態が正常のラットに同種同所移植することで腎癌の肺転移モデルを作製した。そこで、肺転移巣から癌細胞株の初代培養を行い、これを腎被膜下に再度移植後、肺転移頻度が増加した株の *in vivo* セレクションを行い、高頻度に肺転移を起こす株 (d5krm #3 及び #7) を樹立した。第 5 世代の高転移株を樹立後、親株との肺転移能を上記移植系により比較した結果、*in vivo* セレクションを重ねるにしたがって、転移能が増大していることが明らかとなった。さらに、高転移株では親株と比較し幹細胞性及び薬剤耐性能の亢進等種々の相違点を見出してきたが、3 次元培養を実施したところ、親株 (d5p) と比較して高転移株では細胞集団の形成および突起伸張 (protrusion) を認めた。したがって、本モデルで得られた高転移株の転移機構に collective cell movement と protrusion の形成という 2 つの現象が関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では EHEN 誘発ラット腎腫瘍より樹立した腎細胞がん株 (d5p) および rRCCd5 の腎被膜下移植により作成した肺高転移株 (krm3 および krm7) を用いて、腎原発癌の肺転移成立における表現型の獲得にかかわる遺伝子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

網羅的遺伝子発現解析

d5p、krm3 および 7 より mRNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析に供した。得られた遺伝子発現量データを Ingenuity pathway analysis (IPA) software に供し、有意な発現変動がみられる pathway の検索を行った。なお、IPA software にて解析する際には d5p に対して、krm3 および 7 の発現量をそれぞれ比較することで発現量比を算出し、1.50 以上および 0.67 以下の発現データを用いて、解析に供した。

網羅的 miRNA 発現量解析

d5p、krm3 および 7 より miRNA を抽出し、網羅的 miRNA 発現量解析を実施した。また、得られた miRNA 発現量データについては IPA software を用いた Targetscan 解析を上記網羅的遺伝子発現量解析データとの複合的解析を行った。

標的遺伝子 KO ベクターの構築

上記遺伝子発現データで得られた高転移株 (krm3 および 7) で共通して発現上昇している miRNA について KO ベクターを CRISPR/Cas9 により構築した。詳細について、以下に記す。

gRNA 鎖の設計

(Mira_A_Top: 5' -ATCCGCAGCTAAGCCCTGCTC CAC -3' , Mira_A_Bottom : 5' -AAACGT GGAGCAGGGCTTAGCTGC-3' , Mira_B_Top : 5' -ATCCCAGCAAAGTCGTGTTACACAG-3' , Mira_B_Bottom : 5' -AAACCAGTGCG GTAGCACAGAGAG-3')、二本鎖オリゴとして合成した。得られたオリゴを CRISPR/Cas9 nickase に挿入し、標的とするベクターを構築した。

HR ターゲティングベクターの構築

CRISPR/Cas9 nickase ベクターの標的領域の外側を標的とする HR ターゲティングベクターを作製した。本実習では Left arm および Right arm を PCR 法にて増幅した。得られた Left および Right arm の増幅産物をベクターに挿入した。

細胞の培養と遺伝子導入

2 種類の細胞 (d5krm3 および krm7) を凍結融解し、10%FBS および 1%ペニシリン/ストレプトマイシン添加 DMEM にて培養を行った。その後コンフルエントに増えたのを確認したのちにトリプシン/EDTA ではがして、細胞数を計測し、 1×10^5 個/ml になるように調整し、6well プレートにそれぞれ 4 か所ずつ播いた。翌日、調整したベクターを用いて形質転換を行った。48 時間後に、hygromycin 添加 DMEM を 0, 50, 100 および 150 (ug/ml) の用量でそれぞれ添加し、72 時間後に 10%FBS および 1%ペニシリン/ストレプトマイシン添加 DMEM に交換した。

形質転換細胞のシングルセルクローニング

上記にて得られた形質転換細胞株をそれぞれ株化するために、シングルセルクローニングを実施した。形質転換細胞に対して、トリプシン/EDTA にてはがした後に、細胞数を計測し、1well 当たり 0.5cell になるように希釈を行って 96well plate に播種した。なお、培地には puromycin を添加し、抗生物質選択を併せて実施した。15 日培養後にコンフルエントになった細胞を 10cm シャーレへ植え替えし、コンフルエントになった細胞を形質転換させたシングルクローン株として樹立した。

形質転換細胞の 3 次元培養および顕微鏡下観察

樹立した形質転換細胞株について、コラーゲン/マトリゲルによる 3 次元培養を実施し、細胞集団形成能について顕微鏡下で観察を行った。

4. 研究成果

網羅的遺伝子発現解析

網羅的解析の結果、親株 (d5p) と比較して、高転移株で有意な発現上昇 (1.5 倍以上) および発現減少 (0.67 倍以下) となった遺伝子数

はそれぞれ、krm3 は 274 遺伝子および 130 遺伝子、krm7 は 111 遺伝子および 913 遺伝子であった。また、高転移株共通で発現上昇している遺伝子が 159 遺伝子、発現減少している遺伝子が 538 遺伝子みられた。IPA software による解析の結果、管腔形成にかかわる遺伝子が多くみられた。興味深いことに、腫瘍の転移と密接にかかわるとされる上皮間葉転換(EMT)関連遺伝子(E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, S-nail など)は、本モデルにおいてはむしろ発現減少傾向がみられた。したがって、本モデルにおける転移様式には EMT とは異なる機序の関与の可能性が示唆された。

網羅的 miRNA 発現解析

網羅的 miRNA 解析の結果、親株と比較して高転移株で発現している miRNA について、krm3 では 82 個の miRNA が有意な発現変動を示した。また、krm3 では 28 個の miRNA が有意な発現変動を示した。なお、高転移株に共通して発現変動がみられた miRNA として 23 個の miRNA が同定された。

標的遺伝子 KO ベクターの構築

上記遺伝子および miRNA の検索の結果、高転移株特異的に発現変動がみられる miRNA が 23 個同定されたことから、これらを KO した細胞株を構築する目的で形質転換および株化を目指した。その結果、恒常的に遺伝子発現が KO された形質転換細胞株を樹立できた。

形質転換細胞の 3 次元培養および顕微鏡下観察

上記にて得られた形質転換細胞株にて、3 次元培養を行った結果、明らかに protrusion 形成能が抑制された。一方、親株と同じ miRNA を強制発現させても protrusion 形成はほとんどみられなかったものの、細胞集団形成能が増大した。

したがって、in vitro における解析の結果、親株と高転移株で影響を受けた表現型が異なることから、細胞集団形成および protrusion 形成のどちらが転移の成立により重要であるのか、in vivo にて腫瘍形成能および転移能・浸潤能について検討する必要がある。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Ishii Naomi, Gi Min, Fujioka Masaki, Yamano Shotaro, Okumura Mai, Kakehashi Anna, Wanibuchi Hideki. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat mediumterm multiorgan carcinogenicity bioassay, *Journal of Toxicologic Pathology*, 30, 39-45, 2017,

doi: 10.1293/tox.2016-0049 査読あり
Doi Kenichiro, Fujioka Masaki, Sokuza Yui, Ohnishi Mariko, Gi Min, Takeshita Masanori, Kumada Kenji, Kakehashi Anna, Wanibuchi Hideki, Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis, *In vivo*, 31, 187-198, 2017, doi:10.21873/invivo.11044 査読あり

Kakehashi Anna, Ishii Naomi, Okuno Takahiro, Fujioka Masaki, Gi Min, Fukushima Shoji, Wanibuchi Hideki, Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in Ogg1 Mutant Mice Induced by Phenobarbital, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-16, 2017, doi: 10.1155/2017/8541064 査読あり

Kakehashi Anna, Ishii Naomi, Okuno Takahiro, Fujioka Masaki, Gi Min, Wanibuchi Hideki, Enhanced Susceptibility of Ogg1 Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1801-1801, 2017, doi:10.3390/ijms18081801 査読あり

Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancer. *Cancer science*, 108, 331-337, 2016. doi:10.1111/cas.13143. 査読あり

Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol Pathol*. 69. 1-7. 2016. doi:10.1016/j.etp.2016.10.002. 査読あり

Fujioka M, Gi M, Kawachi S, Tatsumi K, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. Examination of in vivo mutagenicity of sodium arsenite and dimethylarsinic acid in gpt delta rats. *Journal of environmental sciences*, 49, 125-130. 2016. doi: 10.1016/j.jes.2016.07.005 査読あり

Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Doi K, Gi M, Wanibuchi H. Ethanol-Extracted Brazilian Propolis exerts prospective effects on tumorigenesis in wistar hannover rats. *PloS One*. 11. 2016.

doi:10.1371/journal.pone.0158654.

査読あり

Kanki M, Gi M, Fujioka M, Wanibuchi H. Detection of non-genotoxic hepatocarcinogens and prediction of their mechanism of action in rats using gene marker sets. *J Toxicol Sci*. 41. 281-292. 2016.
doi:10.2131/jts.41.281. 査読あり

〔学会発表〕(計 13 件)

藤岡正喜、魏民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 第 23 回ヒ素シンポジウム. 2017

藤岡正喜、奥野高裕、石井真美、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. 非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスを用いた肝細胞癌の発がんメカニズム解析. 第 14 回日本病理学会カンファレンス, 2017

藤岡正喜、魏民、河内聡子、梯アンナ、鰐淵英機. 1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタン複合曝露によるマウス肝臓への影響. 第 44 回日本毒理学学会学術年会. 2017

藤岡正喜、魏民、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. Carcinogenicity induced by prenatal exposure to dimethylarsinic acid in CD1 mice. 第 76 回日本癌学会学術総会. 2017

藤岡正喜. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 DMA の発がん性およびその機序. 先端モデル動物支援プラットフォーム若手講習会. 2017

藤岡正喜、魏民、河内聡子、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. ラット肝発がん物質ダンマル樹脂による非遺伝毒性肝発がん機序の検討. 2017 先端モデル動物支援プラットフォーム. 2017

藤岡正喜、魏民、河内聡子、梯アンナ、鰐淵英機. 1,2-ジクロロプロパン及びジクロロメタン複合曝露によるマウス肝臓への影響. 第 16 回分子予防環境医学研究会. 2017

藤岡正喜、魏民、河内聡子、辰己久美子、梯アンナ、鰐淵英機. ラット経尿道直接膀胱暴露法を用いた有機ヒ素化合物 DMMTA の in vivo 変異原性の検討. 第 33 回日本毒性病理学会総会および学術集会. 2017

藤岡正喜、魏民、河内聡子、熊田賢次、鰐淵英機. F344 gpt delta ラット膀胱粘膜および肝臓における iAsIII および DMAV の in vivo 変異原性の検討. 第 22 回ヒ素シンポジウム. 2016

Fujioka M, Gi M, Kawachi S, Tatsumi K, Kumada K, Wanibuchi H. Evaluation of in vivo mutagenicity of iAsIII and

DMAV in gpt delta F344 rats. IUTOX XIV International Congress of Toxicology Meerida-Mexico. 2016

藤岡正喜、魏民、山野莊太郎、河内聡子、土井賢一郎、石井真美、梯アンナ、鰐淵英機. NADPH oxidase 阻害剤 Apocynin は酸化ストレスの抑制を介し EHEN 誘発ラット腎発がんを抑制する. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会. 2016

藤岡正喜、山野莊太郎、魏民、河内聡子、辰己久美子、熊田賢次、鰐淵英機. ラット腎癌肺高転移株を用いた転移亢進に寄与する分子生物学的特性の検討. 第 13 回日本病理学会カンファレンス. 2016

藤岡正喜、魏民、河内聡子、辰己久美子、熊田賢次、鰐淵英機. 非遺伝毒性ラット肝発がん物質ダンマル樹脂の発がん機序の検討. がん予防学術大会 2016. 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤岡 正喜 (FUJIOKA Masaki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号: 10648463